笼养和散养蛋鸡小肠细菌菌群区系的聚合酶链式反应－变性梯度凝胶电泳分析

崔一喆[1]　王秋菊[1*]　李　悦[1]　苏　景[2]　周亚强[1]　张宇辰[1]

（1.黑龙江八一农垦大学动物科技学院，大庆 163319；2.黑龙江省动物疫病预防与控制中心，哈尔滨 150069）

摘　要：本试验对笼养和散养蛋雏鸡和成年蛋鸡的小肠中细菌种类进行分析。取 8 周龄雏鸡和 30 周龄产蛋鸡整个小肠内容物，进行聚合酶链式反应－变性梯度凝胶电泳（PCR-DGGE）分析，结合指纹克隆，研究鸡小肠细菌菌群的 DNA 指纹图谱。结果显示，共从蛋鸡的肠内容物中分离出 39 株细菌，有 4 个菌门，包括变形菌（2 株，5.1%），拟杆菌（4 株，10.2%），放线菌（5 株，12.8%）和厚壁菌门（21 株，53.8%），以及 7 个环境样品（不可培养细菌）。不同阶段蛋鸡不同肠段存在不同的细菌种类，在成年母鸡和自由放养鸡肠道中的细菌种类比雏鸡和笼养鸡丰富。所有分离细菌中，共分离得到 10 株乳酸菌，除陪伴粪球菌外，其余 9 株乳杆菌作为微生态制剂后备菌保存。结果提示，饲养模式和饲养阶段对蛋鸡肠道中细菌群落种类分布有很大影响，散养模式细菌群落更丰富，成年鸡较雏鸡肠道细菌多。

关键词：蛋鸡；笼养；散养；PCR-DGGE；菌群鉴定

中图分类号：S811.6　　文献标识码：A　　文章编码：1006-267X(2016)00-0000-00

家禽肠道是一个复杂而多样的生态环境，其体内微生物超过 400 种，这些微生物对宿主的正常发育和营养物质的消化吸收起着重要的作用。长期以来，由于微生物形态过于简单，缺乏明显的外部特征，人们对环境中细菌菌群结构的了解不多。随着基于 16S rDNA 分子技术的发展，更全面更深入地了解微生物菌落结构成为可能，其中变性梯度凝胶电泳/温度梯度凝胶电泳（DGGE/TGGE）技术被用于检测人类[1]、猪[2]、鸡[3]等动物胃肠道主要细菌的结构和多样性[4]。肠道菌群失调会减弱机体对营养物质的吸收率，降低机体免疫力，削弱肠道的屏障功能[5]，影响畜禽的生长和健康，所以对肠道微生物是否会导致动物肠道功能紊乱等相关研究十分迫切。目前，对宿主与肠道微生物之间相互作用的了解非常有限，直接限制了对动物肠道微生物与肠道功能的研究。因此，本研究通过特定细菌物种通用引物聚合酶链式反应－变性梯度凝胶电泳（PCR-DGGE）方法，对笼养和散养的雏鸡及产蛋鸡所有肠道肠内容物菌群 16S rDNA V3 区进行 PCR-DGGE 指纹图谱比较分析，研究不同饲养

收稿日期：2015－12－17

基金项目：黑龙江省自然科学基金项目（C201444，C2015040）；黑龙江八一农垦大学校培育课题（XZR2014-05）

作者简介：崔一喆（1979－），男，黑龙江鸡西人，博士，讲师，主要从事动物肠道疾病及营养调控研究。E-mail: cuiyizhe1979@126.com

*通信作者：王秋菊，副教授，硕士生导师，E-mail: wqj_9@163.com

方式下不同生长阶段蛋鸡十二指肠、空肠、回肠和盲肠中细菌种群结构和多样性的发育性变化，旨在为了解家禽肠道菌群结构和分离特异性有益菌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物与样品采集

试验动物分别选自大庆兴和牧业蛋鸡养殖场的笼养蛋鸡和大庆林甸散养蛋鸡，品种均为海蓝灰蛋鸡系。随机选取体重相近的 8 和 30 周龄的笼养与散养蛋鸡各 25 只，剖杀，取全部小肠，同时分别取相同周龄饲养方式相同的每 5 只鸡的十二指肠、空肠、回肠和盲肠的肠道内容物并分别混匀，按每管 1 g 分装至 5 mL 离心管中，－20 ℃保存。

1.2 DNA 提取

采用十二烷基硫酸钠（SDS）高盐抽提法提取样品基因组 DNA[6]。用细菌基因组 DNA 提取试剂盒（上海海博生物有限公司）进行过柱纯化和溶解，最终总 DNA 溶于 30 μL 无菌水中，－20 ℃保存。

1.3 细菌 16S rDNA 片段的 PCR 扩增

以样品基因组 DNA 为模板，采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R 扩增样品 16S rDNA 高变区序列（表 1）[7]。

PCR 扩增体系（50 μL）为：10× PCR buffer 5 μL；dNTP（2.5 mmol/L）3.2 μL；rTaq（5 U/μL）0.4 μL；GC-338F（20 mmol/L）1 μL；518R（20 mmol/L）1 μL；模板 DNA 50 ng；补 ddH_2O 至 50 μL。PCR 扩增程序为：94 ℃预变性 5 min；94 ℃变性 1 min，55 ℃复性 45 s，72 ℃延伸 1 min，30 个循环；最终 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物采用 OMEGA 公司 DNA Gel Extraction Kit 纯化回收。

PCR 仪为 Biometra 公司生产的 T-Gradient，凝胶成像仪为 Bio-Rad 公司的 Gel－Doc2000 凝胶成像系统。

表1 引物及序列

Table 1 Primer and sequences

引物 Primer	序列 Sequence
338F	CCT ACG GGA GGC AGC AG
518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG
GC-338F	CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCGCGGGGGG CCT ACG GGA GGC AGC AG

1.4 PCR 产物的 DGGE 分析

取 10 μL PCR 产物进行 DGGE 分析。采用变形梯度为 35%～55%、浓度为 8%的聚丙烯酰胺凝胶，化学变性剂为 100%尿素 7 mol/L 和 40%（体积分数）的丙烯酰胺，在 1×TAE 缓冲液中 150 V、60 ℃下电泳 5 h。

1.5 DGGE 图谱中优势条带的回收与测序

用灭菌的手术刀切下待回收 DGGE 条带，采用 OMEGA 公司 Poly-Gel DNA Extraction

Kit 回收目的条带。以 2 μL 回收产物为模板，338F/518R 为引物进行 PCR 扩增。将重新扩增的 DNA 片段切胶回收、纯化后，连接到 PMD18-T 载体上，并转化至 DH5α 感受态细胞中，筛选阳性克隆，菌液由北京华大基因研究中心对插入的细菌 16S rDNA 片段进行序列测定。

1.6 数据分析

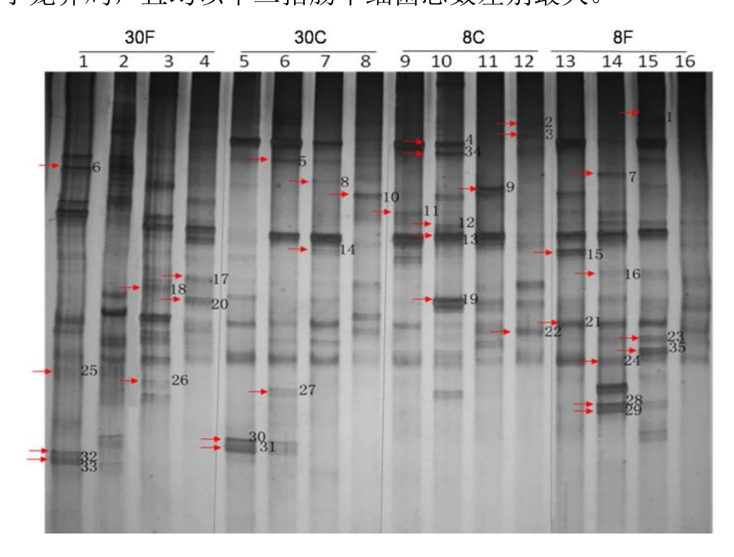
用 Quantity One 软件对鸡各段肠道分离的细菌的 PCR-DGGE 指纹图谱进行条带计数和模拟，在 GenBank 中使用 Blast 程序进行同源性比较，获得最相似典型菌株的 16S rDNA 序列。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物的 DGGE

分别从 8 和 30 周龄笼养和散养蛋鸡的十二指肠、空肠、回肠和盲肠内容物中提取总 DNA，经电泳分析，各肠道内容物总 DNA 分子量相近，均在 2 000 bp 以上，说明总 DNA 提取一致。以鸡各肠道内容物提取的细菌总 DNA 为模版，以 GC-338F 和 518R 为引物扩增 16S rDNA 序列、得到约 200 bp 的 DNA 片段用于 DGGE 分析。

样品 16S rDNA PCR 产物的 DGGE 分析结果如图 1。小肠内容物的特定菌群分析表明，细菌通用引物扩增中 16 个样本中均得到 16S rDNA V3 区片段，利用上述已得到片段 16S rDNA V3 区进行 PCR-DGGE 指纹图谱和聚类分析。不同饲养模式不同年龄鸡小肠肠道细菌种类丰富，且不相同。共分离 35 条带，十二指肠、空肠、回肠和盲肠中细菌总条带数，8 周龄笼养雏鸡分别为 8、12、8 和 9 条，散养雏鸡分别有 8、13、14 和 9 条；笼养成年蛋鸡分别有 13、12、9 和 9 条，散养成年蛋鸡分别有 16、15、13 和 10 条。各鸡各肠道中虽然有些共性条带，但 30 周龄成年蛋鸡肠道菌种数量多于 8 周龄雏鸡肠道菌种数量，散养鸡肠道细菌总数多于笼养鸡，且均以十二指肠中细菌总数差别最大。



8 和 30 代表周龄；字母 F 表示散养，C 表示笼养；1~4，5~8，9~12，13~16 分别为各鸡十二指肠、空肠、回肠和盲肠细菌。

8 and 30 mean week of age; F means free range and C means cage range; 1 to 4, 5 to 8, 9 to 12, and 13 to 16

mean bacteria from duodenum, jejunum, ileum and cecum of chicken, respectively.

图1　DGGE条带分析结果

Fig.1　Analysis results of DGGE bands

2.2　各样品之间的细菌群落结构相似性

从各鸡小肠中共分离出 39 株菌，根据各肠道中总细菌种属数量中的相同细菌种属的比例，进行菌种遗传相似系数计算，非加权分组平均法（UPGMA）聚类图如图 2 所示。

不同饲养模式雏鸡和成年蛋鸡不同肠道中细菌群落的组成有很大差异。相同周龄相同肠道组织中菌种遗传相似系数很低，30 周龄散养和笼养蛋鸡小肠中细菌菌种相似系数为 18.9%~33.5%；8 周龄散养和笼养蛋鸡小肠中细菌菌种相似系数为 17.0%~33.3%。相同饲养模式下，不同周龄蛋鸡相同肠道组织中菌种相似系数较高。散养条件下，8 和 30 周龄蛋鸡各肠道细菌菌种相似系数为 19.4%~35.2%；笼养条件下，8 和 30 周龄蛋鸡各肠道细菌菌种相似系数为 33.1%~49.1%，明显高于散养条件下不同周龄蛋鸡肠道菌群分布的相似性，说明笼养环境相对稳定，散养环境复杂，散养环境下鸡只采食的细菌类别可变性较大。菌群相似性指数是测量群落间或样方间相似程度指数指标，相似性指数的高低说明细菌群落相似程度，也可间接地说明共性菌群以外的菌群情况。由上述结果中可知，不同饲养环境不同周龄鸡肠道菌群组成差别较大，饲养模式、周龄及肠道部位均影响鸡肠道中细菌的多样性。

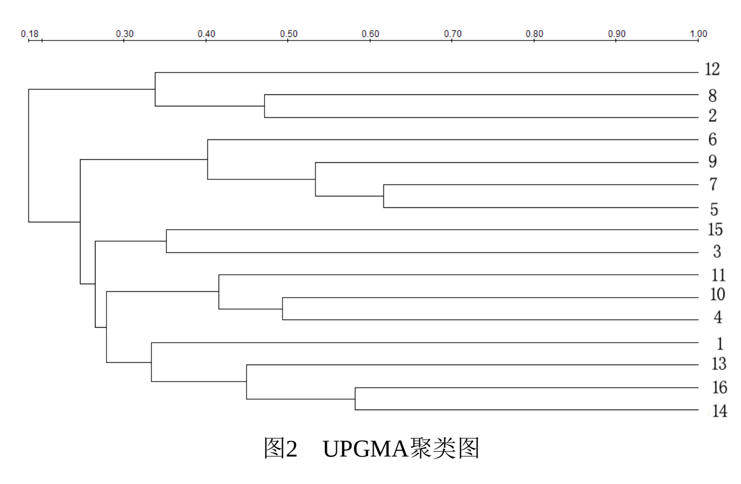


图2　UPGMA聚类图

Fig.2　Dendrogram based on the unweighted pair-group method analysis (UPGMA)

2.3　主要电泳条带的序列测定

DGGE 凝胶条带回收后，以 338F/518R 为引物进行 PCR 扩增，获得约 200 bp 的 DNA 片段。PCR 产物纯化后连接到 pMD18-T 载体上，转化至 DH5α 感受态细胞中，筛选阳性克隆测序。指纹图谱中分别割胶回收测序结果见表 2，测序结果与 GenBank 中的序列进行比对，得到条带所代表的细菌类型，绘制系统发育树，如图 3 所示。在 39 个测序结果中，与 GenBank 数据库中微生物的同源性绝大多数均大于 92%，有的同源性甚至达到 100%。

经鉴定，蛋鸡小肠中细菌种类分为 4 个菌门，为变形菌（Proteobacteria）、拟杆菌（Bacteroidetes）、放线菌（Actinobacteria）、厚壁菌（Firmicutes）以及环境样品（environmental

samples）。其中 2 株变形菌（占总菌比例 5.1%）为鲁氏不动杆菌（*Acinetobacter lwoffii*）（条带 8）和哥假黄单胞菌（*Pseudoxanthomonas mexicana*）（条带 21），均仅在散养鸡肠道中检测到，分别为 8 周龄雏鸡的空肠和 30 周龄成年蛋鸡的回肠中。4 株拟杆菌（占总菌比例 10.2%），为蓝斑拟杆菌（*Bacteroides plebeius*）（条带 2）、丁酸弧菌（*Butyricimonas virosa*）（条带 13_2）、克拉副普氏菌（*Paraprevotella clara*）（条带 14）和 *Alistipes putredinis*（条带 33），其中条带 2 为相似度 89%的蓝斑拟杆菌亚种，与条带 3 同源的丁酸弧菌存在各鸡的小肠中；条带 14 为相似度 72%的克拉副普氏菌变种，在散养鸡肠道中和 8 周龄的笼养鸡空肠中检测到；而条带 33 同源菌 *Alistipes putredinis* 仅在成年蛋鸡小肠中发现。

5 株放线菌（占总菌比例 12.8%）包括 2 株阴道加德菌（*Gardnerella vaginalis*）（条带 28 和 29），3 株螺旋链霉菌（*Streptomyces spiralis*）（条带 30、31 和 32），其中条带 28 和 29 是相似度 92%的变种，同源于阴道加德菌；条带 30、31 和 32 为相似度 100%的同源螺旋链霉菌；条带 28 同源的阴道加德菌和条带 30、31 和 32 同源的螺旋链霉菌存在各鸡小肠中；而阴道加德菌（条带 29）仅在 30 周龄散养成年蛋鸡肠道中发现。

本试验分析的 39 株细菌中，有 21 株为厚壁菌（占总菌比例 53.8%），是蛋鸡小肠中的优势菌群。其中乳酸菌（*Lactobacillus*）属共有 10 株（占总菌比例 25.6%），是厚壁菌中的优势菌属（占 47.6%），包括 3 株鸟乳酸菌（*Lactobacillus aviaries*）、3 株棉子糖乳酸菌（*Lactococcus raffinolactis*）、1 株敏捷乳杆菌（*Lactobacillus agilis*）、1 株陪伴粪球菌（*Coprococcus comes*）、1 株同代乳杆菌（*Lactobacillus equigenerosi*）和 1 株嗜酸乳杆菌（*Lactobacillus acidophilus*）。30 周龄散养和笼养成年蛋鸡小肠中各检测到 7 株乳酸菌，而 8 周龄的雏鸡小肠中分别检测到 5 株（散养）和 6 株（笼养）。各鸡小肠均有的共同乳酸菌为 3 种，分别是鸟乳酸菌（条带 4、5 和 23）、棉子糖乳酸菌（条带 6 和 25）和同代乳杆菌（条带 15_1）；其中条带 4 和条带 23 相似性仅为 31%，与鸟乳酸菌相似性仅为 27%，而他们与条带 5 的相似性达 98%，说明条带 4 和 23 为鸟乳酸菌的新种；条带 15 与同代乳杆菌的相似性仅为 36%，在各鸡小肠中均检测到，为鸡肠道中共同菌种；棉子糖乳酸菌（条带 6_1 和 6_2）在各鸡小肠中存在，但在十二指肠中未检测到，是鸡后段小肠中存在的共同菌种。敏捷乳杆菌（条带 11）、陪伴粪球菌（条带 12）和嗜酸乳杆菌（条带 34）为不同日龄鸡特有的乳酸菌种。其中条带 11 与敏捷乳杆菌相似度为 87%，是敏捷乳杆菌的亚种，仅分离自 8 周龄笼养和散养的小鸡肠道中，30 周龄成年鸡肠道中未发现；条带 12 与陪伴粪球菌的相似度为 70%，是陪伴粪球菌的变种，仅分离自 30 周龄笼养和散养的成年蛋鸡小肠中，8 周龄雏鸡肠道中未发现；条带 34 与嗜酸乳杆菌相似性为 84%，是嗜酸乳杆菌的亚种，仅在散养 30 周龄鸡的十二指肠中检测到，在其他鸡肠道中均未检测到，是散养成年鸡小肠中特有菌种。

厚壁菌中有 6 株梭菌属（*Clostridium*）（占总菌的 15.4%），分别为普氏梭杆菌(*Fusobacterium plautii*)（条带 1）、第三梭状芽孢杆菌(*Clostridium tertium*)（条带 7）、缓腐

梭菌(*Clostridium lentocellum*)（条带 17）、艰难梭菌(*Clostridium difficile*)（条带 24）、煎盘梭菌(*Clostridium sartagoforme*)（条带 26）和不规则梭菌(*Clostridium irregulare*)（条带 27）。其中普氏梭杆菌、第三梭状芽孢杆菌和煎盘梭菌在各鸡小肠中检测到，是鸡的共同梭菌；而条带 1 与普氏梭杆菌相似性为 92%，是普氏梭杆菌的亚种，条带 17 与缓腐梭菌相似性为 90%，是缓腐梭菌的亚种，条带 26 与煎盘梭菌相似性为 90%，为煎盘梭菌的亚种。条带 7 与第三梭状芽孢杆菌相似度仅为 32%，仅在成年蛋鸡肠道中检测到，雏鸡小肠中不存在或未检出；条带 27 与不规则梭菌相似性为 89%，是不规则梭菌变种，仅在散养雏鸡小肠中发现，而在其他鸡小肠中未检出；条带 24 与艰难梭菌相似性为 85%，是艰难梭菌变种，是雏鸡小肠共同菌株，而在成年散养蛋鸡小肠中未发现。厚壁菌中还有 4 株菌，分别为鲁梅利杆菌(*Rummeliibacillus stabekisii*)、普氏粪杆菌(*Faecalibacterium prausnitzii*)以及加洛链球菌(*Streptococcus gallolyticus*)。这 3 株菌在散养成年蛋鸡小肠中均检测到，且与普氏粪杆菌同源的条带 9 是散养成年蛋鸡小肠中特有菌属，而与鲁梅利杆菌同源的条带 3 和与加洛链球菌同源的条带 10 在散养雏鸡小肠中也检测到。

另在鸡肠道中检测到 7 株环境样品（占总菌比例 17.9%）是不可培养菌(uncultured bacterium)(条带 13_1、16、18、19、20、22 和 35)，且这 7 株菌相似性均高于 97%，在各鸡小肠中均有发现，普遍存在鸡肠道中。

以上结果说明，饲养模式和肠道部位影响鸡肠道细菌的结构。

表2 细菌种属分析结果

Table 2 Analytic results of bacterial species

条带编号 Band No.	最相似菌株名称 The most similar strains' name	登录号 Accession No.	相似度 Similarity/%	菌门 Bacterial phylum
1	普氏梭杆菌 *Fusobacterium plautii*	NR_029356	97	厚壁菌 Firmicutes
2	蓝斑拟杆菌 *Bacteroides plebeius*	NR_041277	99	拟杆菌 Bacteroidetes
3	鲁梅利杆菌 *Rummeliibacillus stabekisii*	NR_043992.1	99	厚壁菌 Firmicutes
4	鸟乳酸菌 *Lactobacillus aviaries*	NR_044703.1	98	厚壁菌 Firmicutes
5	鸟乳酸菌 *Lactobacillus aviaries*	NR_044703.1	98	厚壁菌 Firmicutes
6_1	棉子糖乳球菌 *Lactococcus raffinolactis*	NR_044359.1	100	厚壁菌 Firmicutes
6_2	棉子糖乳球菌 *Lactococcus raffinolactis*	NR_044359.1	99	厚壁菌 Firmicutes
7	第三梭状芽孢杆菌 *Clostridium tertium*	NR_037086.1	95	厚壁菌 Firmicutes
8	鲁氏不动杆菌 *Acinetobacter lwoffii*	NR_026209.1	98	变形菌 Proteobacteria
9_1	普氏粪杆菌 *Faecalibacterium prausnitzii*	NR_028961.1	95	厚壁菌 Firmicutes
9_2	普氏粪杆菌 *Faecalibacterium prausnitzii*	NR_028961.1	96	厚壁菌 Firmicutes
10	加洛链球菌 *Streptococcus gallolyticus*	NR_074849.1	99	厚壁菌 Firmicutes
11	敏捷乳杆菌 *Lactobacillus agilis*	NR_044700.1	98	厚壁菌 Firmicutes
12	陪伴粪球菌 *Coprococcus comes*	NR_044048.1	92	厚壁菌 Firmicutes
13_1	不可培养菌 Uncultured bacterium	HM192239.1	100	环境样本 Environmental samples

13_2	丁酸弧菌 *Butyricimonas virosa*	NR_041691.1	92	拟杆菌 Bacteroidetes
14	克拉副普氏菌 *Paraprevotella clara*	NR_041626.1	96	拟杆菌 Bacteroidetes
15_1	同代乳杆菌 *Lactobacillus equigeneros*	NR_041566.1	95	厚壁菌 Firmicutes
15_2	克劳森球菌 *Pediococcus claussenii*	NR_075029.1	95	厚壁菌 Firmicutes
16	不可培养菌 Uncultured bacterium	JQ013040.1	100	环境样本 Environmental samples
17	缓腐梭菌 *Clostridium lentocellum*	NR_026101.1	96	厚壁菌 Firmicutes
18	不可培养菌 Uncultured bacterium	JN021901.1	99	环境样本 Environmental samples
19	不可培养菌 Uncultured bacterium	AB666120.1	99	环境样本 Environmental samples
20	不可培养菌 Uncultured bacterium	EU473569.1	99	环境样本 Environmental samples
21	哥假黄单胞菌 *Pseudoxanthomonas mexicana*	NR_025105.1	99	变形菌 Proteobacteria
22	不可培养菌 Uncultured bacterium	AB506418.1	99	环境样本 Environmental samples
23	鸟乳酸菌 *Lactobacillus aviaries*	NR_044703.1	98	厚壁菌 Firmicutes
24	艰难梭菌 *Clostridium difficile*	NR_074454.1	100	厚壁菌 Firmicutes
25	棉子糖乳球菌 *Lactococcus raffinolactis*	NR_044359.1	100	厚壁菌 Firmicutes
26	煎盘梭菌 *Clostridium sartagoforme*	NR_026490.1	99	厚壁菌 Firmicutes
27	不规则梭菌 *Clostridium irregulare*	NR_029249.1	100	厚壁菌 Firmicutes
28	阴道加德菌 *Gardnerella vaginalis*	NR_044694.1	96	放线菌 Actinobacteria
29	阴道加德菌 *Gardnerella vaginalis*	NR_044694.1	96	放线菌 Actinobacteria
30	螺旋链霉菌 *Streptomyces spiralis*	NR_044142.1	100	放线菌 Actinobacteria
31	螺旋链霉菌 *Streptomyces spiralis*	NR_044142.1	100	放线菌 Actinobacteria
32	螺旋链霉菌 *Streptomyces spiralis*	NR_044142.2	99	放线菌 Actinobacteria
33	*Alistipes putredinis*	NR_025909.1	99	拟杆菌 Bacteroidetes
34	嗜酸乳杆菌 *Lactobacillus acidophilus*	NR_075049.1	99	厚壁菌 Firmicutes
35	不可培养菌 Uncultured bacterium	JX183818.1	100	环境样本 Environmental samples

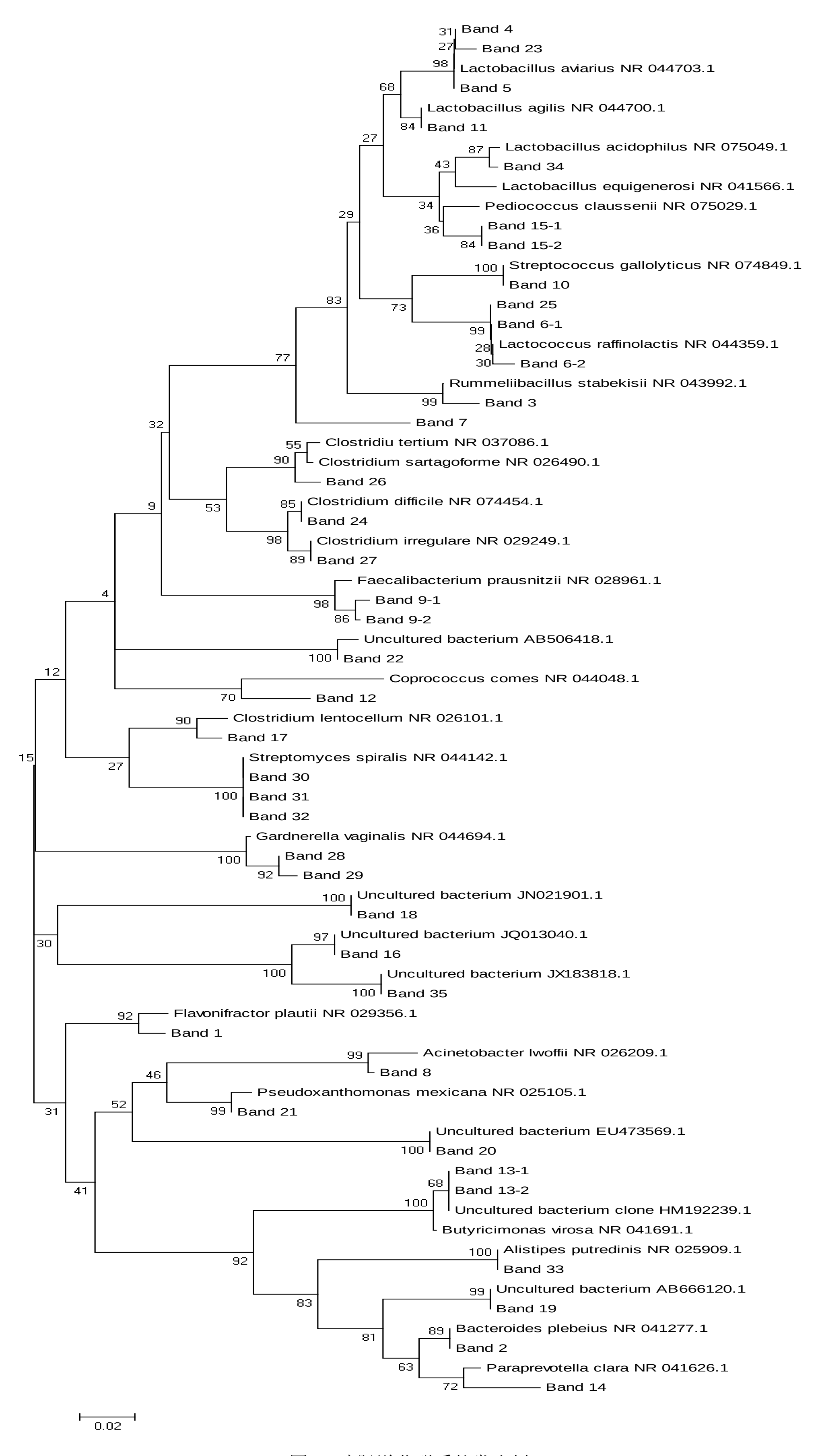


图3　鸡肠道菌群系统发育树

Fig.3　Phylogenetic tree of chicken intestinal flora

3 讨 论

肠道微生物可通过养分的利用和胃肠道系统的发育来影响宿主的营养、健康和生长性能。肠道微生物菌群的组成，会对宿主的健康和生长产生影响。对人类[8]、猪[9]、鸡等的研究结果均证实不同个体肠道菌群指纹图谱有差异，即使是饲养于相同环境、饲喂相同饲料、相互接触的同龄鸡，都会表现出不同的带谱，说明宿主因素对肠道菌群的组成影响很大。由于动物种类[10]、饲养环境、温度[11]等均影响肠道菌群结构，且基于传统培养方法很难全面地反映或比较肠道菌群的结构特征，本研究采用先进且有效的 DGGE 技术对笼养和散养模式下 8 和 30 周龄海蓝褐蛋鸡十二指肠、空肠、回肠和盲肠内容物中细菌组成进行研究，分析不同饲养方式下蛋鸡肠道中微生物类群发育性变化。从所有鸡整个小肠中发现 35 个菌属的细菌，散养鸡较笼养鸡小肠中细菌种属相对较多，散养雏鸡整个小肠中细菌总数较笼养雏鸡的多 7 株，而散养成年蛋鸡比笼养成年蛋鸡小肠细菌总数多 11 株；相同饲养模式，成年鸡肠道菌群较雏鸡阶段丰富，主要表现在十二指肠中细菌数量相差较多，空肠之后的肠道中细菌总数相差不多。如散养条件下，雏鸡十二指肠细菌有 8 株，成年蛋鸡有 16 株；笼养条件下，雏鸡十二指肠有 8 株细菌，成年蛋鸡有 13 株，证实禽的生活环境对肠道中菌的生存有很大影响。

为了开发动物用益生菌制剂菌，在各个肠道均存活的乳酸菌株将作为后备菌进行研究。本研究从鸡各肠道分离出乳酸菌株共 10 株。目前，关于同代乳杆菌的研究报道仅有 3 篇[12-14]，且均是从马的肠道中分离出来或是做成微生态制剂饲喂马。对该菌进行生物学特性研究发现，同代乳杆菌具有高耐酸耐胆盐能力，可以在 pH 为 3.0 的环境存活，对肠上皮细胞黏附力高达 60%以上，没有致病性，且能够降低马血液胆固醇含量和尿素含量，可作为益生菌进行开发。本研究首次从笼养蛋雏鸡肠道中分离出同代乳杆菌，根据以上研究结果显示，同代乳杆菌可以作为蛋鸡用微生态制剂的后备菌在未来试验中进一步研究。鸟乳酸菌仅在 Waters 等[15]的一篇综述中提到过，可能作为微生态制剂菌，没有发现其他的相关研究报道。关于敏捷乳杆菌的研究有 3 个，最早的研究是 Palop 等[16]研究发现一株敏捷乳杆菌 R16 能够在含有芥末籽提取物的环境中生长，并可以降解硫甙，说明该菌具有一定的生命抗性和生物活性；Baele 等[17]证实敏捷乳杆菌为鸽子肠道中乳酸菌属的重要组成部分；最近的研究，即 Stephenson 等[18]研究发现，敏捷乳杆菌为肉鸡肠道常驻乳酸菌属菌株，具有高黏附和定植力，并具有高效表达抗菌蛋白的功能；本研究发现了敏捷乳杆菌，通过以上研究的对比，说明该菌在禽类肠道具有很好的定植的能力和适应性，因此敏捷乳杆菌可作为微生态制剂菌进行进一步研究。

关于棉子糖乳球菌的研究都是近两年的，且均为发酵牛奶中关于该菌的研究[19-20]，至今没有从禽肠道中分离鉴定该菌的研究，但 Meslier 等[19]的研究中提到棉子糖乳球菌为环境中的常见乳酸菌，而本研究在鸡肠道中分离出该菌，根据前人研究它的促发酵作用，该菌具有微生态制剂后备菌的特性，具体应用效果有待于进一步研究。关于陪伴粪球菌的研究，

多数为 20 世纪 90 年代前的[21]，最近的仅有 1 篇，为 Graessler 等[22]的研究，均是说明陪伴粪球菌在肠道中数量的增多与克罗恩氏病（节段性肠炎）有关，因此该菌不可作为微生态制剂菌。

此外，鸡各肠道还有 3 株非乳酸菌属共同菌，为 1 株鲁梅利杆菌和 2 株阴道加德菌。而其中阴道加德菌，有多个研究表明该菌为致病菌[23-24]，会产生生殖道炎症，因此不可作为益生菌制剂后备菌研究。目前，直接研究鲁梅利杆菌菌属的报道仅有 2 篇[25-26]，均是从土壤中分离并鉴定的，但是 Vaishampayan 等[25]分离出的鲁梅利杆菌，经测定严格需氧，耐高盐，28~32 ℃生长良好；而 Her 等[26]分离出的鲁梅利杆菌菌株不耐盐（NaCl<1.5%），也不耐酸（pH 5~10），不具有微生态制剂菌的优良特性。因此本研究分离出的芽孢杆菌属鲁梅利杆菌，是否可作为微生态制剂制备菌，有待于进一步的研究确定。

4 结 论

① 饲养模式和饲养阶段对鸡肠道中细菌群落种类分布有很大影响，散养模式细菌群落更丰富，成年鸡较雏鸡肠道细菌多；肠道不同肠段决定细菌种类的多样性和特异性，尤其是小肠入口的十二指肠是各鸡细菌种类差异最明显的肠段。

② 本研究分离鉴定出 9 株乳酸菌和 1 株芽孢杆菌，其中除同代乳杆菌已在马属动物上作为微生态制剂菌应用过外，鸟乳酸菌、敏捷乳杆菌、棉子糖乳球菌及鲁梅利杆菌是否可作为微生态制剂制备菌，均有待于进一步的研究确定，可作为后备菌保存。

参考文献：

[1] ZWIELEHNER J,LASSL C,HIPPE B,et al.Changes in human fecal microbiota due to chemotherapy analyzed by TaqMan-PCR,454 sequencing and PCR-DGGE fingerprinting[J].PLoS One,2011,6(12):e28654,doi:10.1371/journal.pone.0028654.

[2] KONSTANTINOV S R,ZHU W Y,WILLIAMS B A,et al.Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA[J].FEMS Microbiology Ecology,2003,43(2):225–235.

[3] WIELEN P W J J,KEUZENKAMP D A,LIPMAN L J A,et al.Spatial and temporal variation of the intestinal bacterial community in commercially raised broiler chickens during growth[J].Microbial Ecology,2002,44(3):286–293.

[4] FLÓREZ A B,MAYO B.PCR-DGGE as a tool for characterizing dominant microbial populations in the Spanish blue-veined Cabrales cheese[J].International Dairy Journal,2006,16(10):1205–1210.

[5] ZOETENDAL E G,COLLIER C T,KOIKE S,et al.Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota:a review[J].The Journal of Nutrition,2004,134(2):464–472.

[6] TAPIA-PANIAGUA S T,CHABRILLÓN M,DÍAZ-ROSALES P,et al.Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup,1858) following probiotic administration[J].Microbial Ecology,2010,60(2):310–319.

[7] FLIEGEROVÁ K,MRÁZEK J,KAJAN M,et al.The effect of maize silage as co-substrate for

swine manure on the bacterial community structure in biogas plants[J].Folia Microbiologica,2012,57(4):281–284.

[8] NADAL I,DONANT E,RIBES-KONINCKX C,et al.Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease[J].Journal of Medical Microbiology,2007,56(12):1669–1674.

[9] WANG S P,BO M J,KONG X F,et al.16S rRNA gene-based analysis of ileal bacterial community and phylogeny in nursing and weaned piglets[J].Animal Husbandry and Feed Science,2009,1(4/5):12–17.

[10] LI X M,YU Y H,FENG W S,et al.Host species as a strong determinant of the intestinal microbiota of fish larvae[J].The Journal of Microbiology,2012,50(1):29–37.

[11] LÜ Y C,LI N,GONG D L,et al.The effect of temperature on the structure and function of a cellulose-degrading microbial community[J].Applied Biochemistry and Biotechnology,2012,168(2):219–233.

[12] ENDO A,ROOS S,SATOH E,et al.*Lactobacillus equigenerosi* sp.nov.,a coccoid species isolated from faeces of thoroughbred racehorses[J].International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2008,58(Pt 4):914–918.

[13] MORITA H,NAKANO A,SHIMAZU M,et al.*Lactobacillus hayakitensis*,*L*. *Equigenerosi* and *L*. *equi*,predominant lactobacilli in the intestinal flora of healthy thoroughbreds[J].Animal Science Journal,2009,80(3):339–346.

[14] BOTHA M,BOTES M,LOOS B,et al.*Lactobacillus equigenerosi* strain Le1 invades equine epithelial cells[J].Applied and Environmental Microbiology,2012,78(12):4248–4255.

[15] WATERS S M,MURPHY R A,POWER R F G.Characterisation of prototype Nurmi cultures using culture-based microbiological techniques and PCR-DGGE[J].International Journal of Food Microbiology,2006,110(3):268–277.

[16] PALOP M L,SMITHS J P,BRINK B T.Degradation of sinigrin by *Lactobacillus agilis* strain R16[J].International Journal of Food Microbiology,1995,26(2):219–229.

[17] BAELE M,DEVRIESE L A,HAESEBROUCK F.*Lactobacillus agilis* is an important component of the pigeon crop flora[J].Journal of Applied Microbiology,2001,91(3):488–491.

[18] STEPHENSON D P,MOORE R J,ALLISON G E.Transformation of,and heterologous protein expression in,*Lactobacillus agilis* and *Lactobacillus vaginalis* isolates from the chicken gastrointestinal tract[J].Applied and Environmental Microbiology,2011,77(1):220–228.

[19] MESLIER V,LOUX V,RENAULT P.Genome sequence of *Lactococcus raffinolactis* strain 4877,isolated from natural dairy starter culture[J].Journal of Bacteriology,2012,194(22):6364.

[20] KIMOTO-NIRA H,AOKI R,MIZUMACHI K,et al.Interaction between *Lactococcus lactis* and *Lactococcus raffinolactis* during growth in milk:development of a new starter

culture[J].Journal of Dairy Science,2012,95(4):2176–2185.

[21] BULL K,MATTHEWS N,RHODES J.Antibody response to anaerobic coccoid rods in Crohn's disease[J].Journal of Clinical Pathology,1986,39(10):1130–1134.

[22] GRAESSLER J,QIN Y,ZHONG H,et al.Metagenomic sequencing of the human gut microbiome before and after bariatric surgery in obese patients with type 2 diabetes:correlation with inflammatory and metabolic parameters[J].The Pharmacogenomics Journal,2013,13(6):514–522.

[23] MACHADO A,JEFFERSON K K,CERCA N.Interactions between *Lactobacillus crispatus* and bacterial vaginosis (BV)-associated bacterial species in initial attachment and biofilm formation[J].International Journal of Molecular Sciences,2013,14(6):12004–12012.

[24] TOMUSIAK A,HECZKO P B,JANECZKO J,et al.Bacterial infections of the lower genital tract in fertile and infertile women from the southeastern Poland[J].Ginekologia Polska,2013,84(5):352–358.

[25] VAISHAMPAYAN P,A MIYASHITA M,OHNISHI A,et al.Description of *Rummeliibacillus stabekisii* gen. nov.,sp. nov. and reclassification of *Bacillus pycnus* Nakamura et al.2002 as *Rummeliibacillus pycnus* comb.nov[J].International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,2009,59(Pt 5):1094–1099.

[26] HER J,KIM J.*Rummeliibacillus suwonensis* sp. nov.,isolated from soil collected in a mountain area of South Korea[J].Journal of Microbiology,2013,51(2):268–272.

Intestinal Microbiological Diversity of Chicken Fed in Cage and Free Range by PCR-DGGE Analysis

CUI Yizhe[1] WANG Qiuju[1*] LI Yue[1] SU Jing[2] ZHOU Yaqiang[1] ZHANG Yuchen[1]

(1. *College of Animal Science and Veterinary, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing* 163319, *China*; 2. *Heilongjiang Province Animal Epidemic Prevention and Control Center, Harbin* 150069, *China*)

Abstract: This study investigated the structural diversity of intestinal bacterial flora in young and adult chicken fed in cage and free range separately. Intestinal samples were collected from 8 and 30 weeks old chickens. Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) was used, in combination with cloning and sequencing of amplified fragments to produce bacterial flora DNA fingerprints. Total of 39 strains were isolated from the intestinal contents of chicken, including 4 sulfer bacteria as 2 Proteobacteria strains (5.1%), 4 Bacteroidetes strains (10.2%), 5 Actinobacteria strains (12.8%) and 21 Firmicutes strains (53.8%), as well as 7 environmental samples (uncultured bacterium). And bacteria species were various in different intestine parts of different chicken, bacteria in adult hens and chicken fed in free range was richer than bacteria in young chicken and chicken fed in cage. Ten *Lactobacillus* stains were isolated. *Coprococcus* was excluded but the rest of nine *Lactobacillus* species were saved to study for probiotics. Results indicate that feeding mode and chicken age have a great influence on the intestinal bacterial community composition, and more bacterial species exist in

adult hens' intestinal tract and fed in free range.

Key words: chicken; cage range; free range; PCR-DGGE; flora identification

---

*Corresponding author, associate professor, E-mail: wqj_9@163.com (责任编辑　田艳明)